

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-234689

(43)Date of publication of application : 17.09.1990

(51)Int.Cl.

C12P 19/26
//(C12P 19/26
C12R 1:46)

(21)Application number : 01-054880

(71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK

(22)Date of filing : 09.03.1989

(72)Inventor : HASHIMOTO MASAMICHI
CHIBA SUSUMU
SAEGUSA HARUHISA
KITAGAWA HIROYUKI
MIYOSHI TERUZO

(54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain hyaluronic acid in high yield stably by culturing FM300, a mutant of Streptococcus equi.

CONSTITUTION: A nutrition-requiring mutant of Streptococcus equi, FM300 (FERM No. 2319) is inoculated in a usual medium and cultured at 6.5 to 9.0pH and 30 to 35° C, the culture mixture is centrifuged to remove cell bodies. Then, the supernatant is treated with an organic solvent such as alcohol or the like to effect precipitation and ultrafiltration is carried out to effect desalination whereby hyaluronic acid is obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報(A) 平2-234689

⑬ Int.Cl.⁵
 C 12 P 19/26
 //(C 12 P 19/26
 C 12 R 1:46)

識別記号 庁内整理番号
 8214-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)9月17日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造方法

⑯ 特 願 平1-54880

⑰ 出 願 平1(1989)3月9日

⑱ 発 明 者 橋 本 正 道 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
 総合研究所内
 ⑱ 発 明 者 千 葉 晋 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
 総合研究所内
 ⑱ 発 明 者 三 枝 治 久 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
 総合研究所内
 ⑱ 発 明 者 北 川 広 進 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
 総合研究所内
 ⑱ 発 明 者 三 好 照 三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
 総合研究所内
 ⑲ 出 願 人 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

明 細 書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

ストレプトコッカス・エキ(Streptococcus equi)の変異株 FM・300(特工研発第2319号)を培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とする該ヒアルロン酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、醗酵法によるヒアルロン酸の製造法に関する。さらに詳しくは、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とするヒアルロン酸の製造法に関する。

〔従来の技術〕

従来ヒアルロン酸はニワトリのトサカ、牛の腹の硝子体又は臍帯等より抽出によつて得られていた。しかしながら抽出法によるヒアルロン酸製造は、分離精製が非常に複雑等の課題を有していた。

その課題を改良するために、ヒアルロン酸を生産する能力を有する微生物を培養し、その培養液から直接ヒアルロン酸を採取する方法が提案されてきたが収量のバラツキがあり、生産性が不安定であつた。

本発明者らは先にヒアルロン酸生産を工業的に実施すべく種々研究を行つた結果、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキの変異株 FM・100が親株よりも高収量で、しかも収量のバラツキが少なく安定的にヒアルロン酸を生成することを見出した(特開昭63-123392号公報)。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしストレプトコッカス・エキの変異株 FM・100を用いてヒアルロン酸生産を行つた際、長期間にわたつて何回も培養を行なう場合、あるいは、培養液の一部を残し、そこに新たな培養地を添加し培養を継続する半連続培養を行なう場合、ヒアルロン酸の収量が徐々に低下し、バラツキも大きく、安定なヒアルロン酸の製造を行つて

(2)

とが困難であつた。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる課題を解決すべく、種々研究を行なつた結果、ストレプトコッカスエキの菌株 $\text{FM} \cdot 100$ から、更に栄養要求性が解除された株として誘導された菌株 $\text{FM} \cdot 300$ (特許第 2319 号) がヒアルロン酸の生産安定性の面で大きく改善されていることを見出し、本発明を完成するに至つた。

すなわち本発明は、ストレプトコッカス・エキ (*Streptococcus equi*) の菌株 $\text{FM} \cdot 300$ (特許第 2319 号) を培養し、ヒアルロン酸を生成誘導せしめることを特徴とする該ヒアルロン酸の製造法である。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 300$ (特許第 2319 号) は、ヒアルロン酸生成能を有するストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 100$ の突然変異株の中から取得することが出来る。

(3)

特許第 2319 号として受託されている。ストレプトコッカス $\text{FM} \cdot 300$ はストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 100$ から更にスレオニン及びフェニルアラニンの栄養要求性が解除され、ストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 100$ が生育できない表 1 に示す培地成分だけからなる人工合成培地によく生育することができる。

(5)

特開平 2-234689(2)

例えば、ストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 100$ を用い、ポリペプトン 1.5 多、酵母エキス 0.5 多、グルコース 2 多の培地で、33℃ で培養し、対数増殖期の菌を、低温で遠心分離により集菌し、生理食塩水を用いて、無菌的に 3 回洗浄する。メタル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む pH 5.0、0.05 M リン酸緩衝液中、30℃ で 1 時間培養したのち、氷冷する。ついで、生理食塩水を用いて、低温で菌体を 3 回洗浄した後、ポリペプトン 1.5 多、酵母エキス 0.5 多、グルコース 2 多の培地で、33℃、3 時間培養し、また生理食塩水を用いて、低温で菌体を 3 回洗浄する。表 1 に示す人工合成培地で、33℃、7 日間液体培養し、増殖してきた培養液をさらに、新しい同じ人工合成培地にうえつき、この操作を 3 回くりかえす。

次に寒天を含む同じ組成の培地上に塗布し、コロニーを分離し、ストレプトコッカス・エキ $\text{FM} \cdot 300$ を得る。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、

(4)

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
グルコース	10000	D, L-ペンタントリカルシウム	0.5		
L-アラニン	200	リボフラビン	0.5		
L-シスチニン	100	チアミン	0.5		
L-グルタミン	350	ピリドキサール	1.0		
L-ヒスチジン	400	ピオチン	0.0025		
L-イソロイシン	200	NAD	0.5		
L-ロイシン	200	K ₂ HPO ₄	500		
L-リジン	200	KH ₂ PO ₄	14000		
L-メチオニン	200	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200		
L-トリプトファン	200	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10		
L-チロシン	200	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10		
L-バリン	200	CaCl ₂ ·2H ₂ O	60		
アセトン	20				

(6)

(3)

特開平 2-234689(3)

本発明に用いる培地は通常の微生物の培養に用いるもので良く、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シクロロース、等の炭素源、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、重硫酸ソーダ、チオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カゼミノ酸、酵母エキス、コーンステイプリカー、大豆加水分解液等の有機栄養源の他、必要に応じて各種アミノ酸、ビタミン類等が好適に用いられる。

これらの培地成分は一括仕込み又は分割添加いずでも採用可能である。

本発明の培養は、通気・攪拌培養等の公知の方法でよく、培養温度は30〜35℃が好ましい。

培養液のpHは、菌の生育と共に低下するため、カ性ソーダ、カ性カリ、アンモニア等のpH調整剤を添加し、pH6.5〜9.0にコントロールする。

また、培養終了後、培養液の一部を残し、そこに新たな培地を添加し培養を継続する半連続培養を行うことも可能である。

(7)

分割し、グルコースが全部消費された時点で培養液900mlを抜き出した。さらにグルコース2g、リン酸第1カリウム0.2g、硫酸マグネシウム7水塩0.05g、チオ硫酸ソーダ0.1g、ポリペプトン1.0g酵母エキス0.5gからなるpH8.5の培地900mlを添加し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃でカ性ソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、5時間後に、グルコース2gを分割し、グルコースが全部消費された時点で培養液900mlを抜き出した。

上記の半連続操作をあと4回くりかえし、計6バッチ行つた結果を表2に示す。

培養液は塩酸でpH4に調整後、蒸留水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエチルアルコールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた硫酸をろ取し、2g食塩水に再溶解後、再びエチルアルコールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを室温で減圧乾燥して、白色のヒ

(9)

このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に、培養液の粘度が次第に上昇してくる。使用炭素源が培養液中で消費された時点で培養を停止し、遠心分離による除菌後、アルコール等の有機溶媒による析出、膜外ろ過による脱塩等の簡単な公知精製法により、高収率でヒアルロン酸が得られる。

〔実施例〕

次に実施例により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

グルコース2g、リン酸第1カリウム0.2g、硫酸マグネシウム7水塩0.05g、チオ硫酸ソーダ0.1g、ポリペプトン1.0g酵母エキス0.5gからなるpH8.5の培地1lに同一培地からなるストレプトコッカス・エキ FM・300の前培養液10mlを接種し、通気量1.5vvm (volume volume minute)、攪拌200回転/分、温度33℃でカ性ソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2gを

(8)

アルロン酸ソーダを得た。

得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトミセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。

表 2

バッチ数	収量g(培養液1lあたり)
1	7.3
2	6.8
3	6.9
4	6.9
5	6.5
6	6.7

比較例1

ストレプトコッカス・エキ FM・100を実施例1と同様にして6回半連続培養したが、得られたヒアルロン酸ソーダはそれぞれ、7.1g、5.0g、4.5g、4.0g、2.5g、2.0gであり収量は突

(10)

特開平 2-234689(4)

施例1に比較して、低く、またばらついていた。

実施例 2

グルコース2g、リン酸第1カリウム0.2g、硫酸マグネシウム7水塩0.05g、チオ硫酸ソーダ0.1g、ポリペプトン1.0g酵母エキス0.5gからなるpH8.5の培地、1gに同一培地からなるストレプトコッカス・エキアム・300の前培養液10mlを接種し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃で中性ソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2gを分添し、グルコースが全部消費された時点で培養を停止した。

培養液を塩酸でpH4に調整後、蒸留水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエチルアルコールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿をろ取し、2g食塩水に再溶解後、再びエチルアルコールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを室温で減圧乾燥して、培養液1

(11)

例2と同様にして、15回くりかえしたが、得られたヒアルロン酸ソーダは第1、4、8、12、15パッチの収量がそれぞれ、7.0g、7.3g、3.9g、6.3g、4.0gであり、収量は実施例1に比較して、低く、またばらついていた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、ヒアルロン酸生産のために数多く繰り返し培養を行ったり、半連続培養を行っても、ヒアルロン酸を高収率で、しかも収量にほとんどばらつきなく、安定に生産することができる。また菌株管理も容易である。

本発明によつて製造されたヒアルロン酸は、化粧品、医薬品に配合して使用できる。

特許出願人 電気化学工業株式会社

gあたり7.7gの白色ヒアルロン酸ソーダを得た。

得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトミセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。

上記と同様の培養を14回くりかえし、全部で15パッチ行なつた結果を表3に示す。

表 3

パッチ数	収量g (培養液1gあたり)
1	7.1
4	7.3
8	7.0
12	7.1
15	7.2

さらに長期的に培養を行なつたが、ヒアルロン酸収量は常に安定していた。

比較例 2

ストレプトコッカス・エキアム・100を実施

(12)